

10/530765

Rec'd PCT/PTO 07 APR 2005

PCT/HU 03 / 0 0 0 7 9

#2

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 10 NOV 2003

WIPO

PCT

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

ELSŐBBSÉGI TANÚSÍTVÁNY

Ügyszám: P0203394

A Magyar Szabadalmi Hivatal tanúsítja, hogy

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet, Szeged,
Magyar Olaj Rt., Szolnok,
Petrolszervíz Kft., Algyő,

Magyarországon

2002. 10. 07. napján 41721/02 iktatószám alatt,

Eljárás hidrofób anyagokat bontó mikroorganizmusok előállítására és mikroorganizmusok
című találmányt jelentett be szabadalmazásra.

Az idefűzött másolat a bejelentéssel egyidejűleg benyújtott melléklettel mindenben
megegyezik.

Budapest, 2003. év 10. hó 18. napján



Szabó Emilné

A kiadmány hitelélül: Szabó Emilné osztályvezető-helyettes

The Hungarian Patent Office certifies in this priority certificate that the said applicant(s) filed a patent application at the specified date under the indicated title, application number and registration number. The attached photocopy is a true copy of specification filed with the application.

3394/02

1. 1. 1. 1.

ELSŐBBSÉGI PÉLDANY

2002-10-07

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

2002-10-07

Eljárás hidrofób anyagokat bontó mikroorganizmusok előállítására és mikroorganizmusok

A találmány tárgyát képezik eljárások hidrofób anyagokat, előnyösen szennyeződéseket, kőolajkomponenseket vagy –származékokat bontó mikroorganizmusok izolált formában történő előállítására, maguk a mikroorganizmusok és alkalmazásuk.

A technika állása szerint ismeretesek különböző szennyeződéseket, kőolajkomponenseket vagy –származékokat bontó mikroorganizmusok, illetve eljárások ezek szelektálására, amely eljárások elve az, hogy a mikroorganizmusokat szénforrásként csupán a lebontandó anyaggal látják el.

Ilyen mikroorganizmusok például azok, amelyeket az Oil Cleaning Bio-Products Ltd. P.O.Boksz 46, Royston, Hertfordshire SG8 9PD U.K cég forgalmaz, például a Hegrem és a Hegboost törzsek (ld a mellékelt terméktájékoztatókat)

Továbbra is fennáll azonban az igény előnyös szelekciós eljárásokra, amelyek során olyan világos kritériumokat alkalmazunk, amelyek nagy biztonsággal hatékony mikroorganizmusokhoz vezetnek el. Igény van továbbá az ismerteknél hatékonyabb mikroorganizmusokra is.

DEFINÍCIÓK

”Talaj” kifejezésbe a leírásban a talaj teljes mélységét beleértjük a felszíni rétegektől (A-szint vagy humuszsztint) az anyakőzettel vagy a vízzáró réteggel érintkező legmélyebb rétegeg (pl. geológiai réteg vagy D-szint).

”Kőolajkomponens” a kőolaj, akár a nyers kőolaj bármely összetevőjét, frakcióját vagy ezek bármilyen keverékét értjük.

”Kőolajszármazék” alatt a kőolaj vagy bármely komponensének bármilyen, mesterségesen előállítható vagy nem geológiai folyamat során keletkező származékát értjük.

A ”tenzid” szó jelentése bármely felületaktív anyag.

„Mikroorganizmus” alatt a leírásban olyan egy- vagy többsejtű vagy sejt szerkezet nélküli, előnyösen egysejtű élőlényeket értünk, amelyek a mikrobiológia vizsgálati körébe tartoznak. Előnyösen a baktériumok, gombák, moszatok, különösen a kékoszátok tartoznak ide.

„Mikroorganizmus-törzs” alatt mikroorganizmusok egyetlen sejtéből kiinduló tiszta tenyészetét értjük, előnyösen egy adott fajnak rendszeres továbbtenyésztésével fenntartott vagy fenntartható tenyészetét.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmány szerinti eljárást.

A találmány tárgya eljárás hidrofób szennyezőanyag, kőolajkomponens vagy -származék bontására alkalmas, a bontó aktivitást a szennyezőanyagot, kőolajkomponenst vagy -származékot tartalmazó hidrofób fázis és egy hidrofil fázis határfelületén kifejteni képes mikroorganizmus izolált formában történő előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) a kőolajkomponenst vagy -származékot tartalmazó filmet szénforrást nem tartalmazó minimál táptalajra visszük fel,

ii) erre a táptalajra kőolajszennyezésből származó, mikroorganizmus-keveréket tartalmazó mintát oltunk le, a leoltás után a táptalajt legalább addig inkubáljuk, amíg észlelhető mikroorganizmus-telepet kapunk, amennyiben azonban ez tetszőlegesen meg-

határozott időtartamon belül nem következik be, az i) és jelen ii) lépéseket megismétljük,

iii) a kapott telepekből származó mikroorganizmusok bontó aktivitását megvizsgáljuk a telepek környezetében és

iv) a kapott telepekből származó, bontó aktivitású mikroorganizmusok tenzidtermelő képességét ellenőrizzük.

A találmány szerinti eljárásban fakultatív anaerób mikroorganizmust állítunk elő, azáltal, hogy anoxikus légzést elősegítő anyagokat, előnyösen elektronakceptorokat és/vagy oxigénforrásokat – célszerűen az alábbiak közül egyet vagy többet: Ti-vegyületek, Mn-vegyületek, nitrit, nitrát foszfát, pirofoszfát, szulfit, szulfát, piroszulfát ionok vagy sóik – tartalmazó minimális tápközeget alkalmazunk, és előnyösen a tenyésztést legalább egy ideig anaerob körülmények között végezzük.

A bontó aktivitást előnyösen a telepek közvetlen környezetében vett minták szennyezőanyag-koncentrációjának vizsgálata vagy a bontott felület átmérője alapján állapítjuk meg. Bontó aktivitásként előnyösen paraffinbontó vagy jellegzetes szennyeződések bontó enzimaktivitást vizsgálunk, előnyösen mintavétel, oldószeres extrakció, majd gázkromatográfiás vizsgálat útján.

A kapott telepekből származó mikroorganizmusok tenzidtermelő képességét egy előnyös lehetőségként hidrofil-hidrofób cseppentési próba alapján vizsgáljuk meg.

Egy további szempont szerint a találmány tárgyát képezik kőolajkomponens vagy -származék bontására alkalmas, a bontó aktivitást a kőolajkomponens vagy származék és egy vizes fázis határfelületén kifejteni képes mikroorganizmus, amely legalább egyféle, a kőolajkomponens vagy -származék bontásának katalizálására alkalmas enzimet, valamint legalább egyféle tenzidet termel.

Előnyösen a mikroorganizmus a *Bacillus subtilis* fajba, *Bacillus cereus* fajba, *Pseudomonas* vagy *Xanthomonas* nemzetségbe tartozó fajba tartozó törzs, előnyösebben fakultatív anaerób.

Igen előnyösen a mikroorganizmus kőolajszennyezés-bontó aktivitása szennyezett táptalajon történő tenyésztéssel kimutatva a Hegrem vagy a Hegboost törzsekénél az alábbi kőolajszennyezések legalább egyikén mérve átlagosan legalább 1,5-szer nagyobb: hidrofób kiválás, aszfaltén, maltén, 5% aszfaltén + olaj.

A találmány szerinti mikroorganizmus előnyösen a találmány szerinti eljárások bármelyikével állítható elő.

Igen előnyösen a találmány tárgyát képezi mikroorganizmus, amely a NCAIM-nál a NCAIM (P) B 1304, NCAIM (P) B 1305, NCAIM (P) B 1306, NCAIM (P) B 1307 vagy a NCAIM (P) B 1308 számon, 2002. április 17-én letétbe helyezett törzsek bármelyike vagy azok bármelyikéből származó törzs. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a mikroorganizmus genetikailag módosított, előnyösen markerként genomjába beépített ismert szekvenciájú DNS-fragmentumot hordoz.

Egy további szempont szerint a találmány tárgyát képezi a találmány szerinti mikroorganizmus alkalmazása kőolajkomponens vagy -származék okozta talajszennyezés lebontására.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat.

Az 1. ábrán az első három Petri-csészében vékony szennyezőanyag-filmre leoltott, izolált baktériumok telepei láthatók. Megfigyelhető, hogy a telepek környezetében a felvitt szennyezőanyagokat átalakítják vagy elbontják, amit a kérdéses anyagok feltisztulása vagy elszíneződése jelez. Amennyiben a bontó aktivitást jellemezni kívánjuk, mérhetjük a feltisztult (elszíneződött) sáv szélességét (átmérőjét).

A 2. ábrán a kapott mikroorganizmus-törzsek tenzidtermelő képességének ellenőrzését mutatjuk be hidrofil-hidrofób cseppentési próba alapján. Jól látható a különbség a szétterülő és a nem nedvesítő csepp között.

A 3. ábrán különböző mikroorganizmus-törzsek gázkromatográfiás vizsgálattal jellemzett hatását mutatjuk be kétféle paraffinminta (V. jelű: 3.a és II. jelű: 3.b ábrák) teljes szénhidrogén-tartalmára 1 hetes inkubáció után. Az oszlopdiagramon az elbontatlan anyagok teljes görbe alatti területe és a lebontatlan mintára jellemző görbe alatti terület arányát tüntettük fel százalékban kifejezve. A vízszintes tengelyen feltüntetett jelzések a következő mikroorganizmus-törzseket jelentik:

| | | |
|--------|-----------|--|
| Ref I | Hegrem* | |
| Ref II | Hegboost* | |
| A | MOL-2 | NCAIM (P) B 1304 |
| B | MOL-32 | NCAIM (P) B 1305 |
| C | MOL-51 | NCAIM (P) B 1306 |
| D | MOL-66 | NCAIM (P) B 1307 |
| E | MOL-107 | NCAIM (P) B 1308 |
| F | MOL-113 | egy, általunk izolált <i>Pseudomonas</i> sp. törzs |

* Forgalmazza: Oil Cleaning Bio-Products Ltd. P.O.Box 46, Royston, Hertfordshire SG8 9PD U.K. ld. a (mellékelt) terméktájékoztatókat.

Az alábbiakban - a korlátozás szándéka nélkül - példákat is felsorolva ismertetjük a találmány szerinti megoldás néhány megvalósítási módját.

Ha a bioremediáció céljából, vagy hidrofób szennyeződések, lerakódások bontása céljából genetikailag eredetileg nem módosított mikroorganizmusokat izolálunk a környezetből, ún. sterilizált "szilárd minimál táptalajt" vagy előnyösen "szilikagél szilárd táptalajt" alkalmazunk (például Petri-csészékben).

Amennyiben előnyösen aerob és anoxikus tevékenységre egyaránt képes mikroorganizmusokat izolálunk, célszerű anorganikus nitrogén, kén, foszforsókat és agar-agart tartalmazó táptalajt, előnyösebben sterilizált szilikagél szilárd táptalajt alkalmazni.

A szilárd minimál táptalajra előnyös valamely oldószerben, előnyösebb gyorsan illanó szerves oldószerben (alkoholban, acetonban, éterben), még előnyösebb pentánban, hexánban, esetleg toluolban oldott, a kérdéses hidrofób szennyező anyagot vagy egyéb lebontandó hidrofób anyagokat (például szénhidrogéneket, kőolajat, komponenseit, ezek származékait, stb.), meghatározott mennyiségben, vékony film formájában felvinni, s a kiválasztandó mikrobák tiszta tenyészetéből erre a "szennyezőfilm-rétegre" leoltást végezni, majd a készítményt megfelelő (pszichrofil, mezofil, termofil, illetve aerob, vagy anaerob) viszonyok között inkubálni. Bizonyos idő elteltével azok a mikrobák, melyek rezisztensek a kérdéses szennyező anyaggal szemben, s azt bontani képesek, rendszerint összefüggő, esetleg jellegzetes morfológiájú vagy pigmentációjú telepet képeznek.

Előnyösen a mikrobák a telepek környezetébe a lebontandó hidrofób anyagokat, például szénhidrogéneket bontó enzimeket, valamint tenzideket (felületaktív anyagokat) bocsátanak ki (1. és 2. ábra).

Az enzimtermelésnek egy jellemzője magának a telep környezetében feltisztult vagy elszíneződött sávnak a szélessége. Ez elsősorban az enzimtermelés intenzitására jellemző (1. ábra). A termelt enzim aktivitását például úgy állapíthatjuk meg, hogy a telepek környezetéből mintát veszünk és abban megvizsgáljuk a szennyezőanyag összetételét, például gázkromatográfiás vizsgálattal (3. ábrák). Az elegendően magas enzimaktivitást mutató mikroorganizmusokat kiválasztjuk.

A tenzideket termelő mikrobákat kiválaszthatjuk a minták hidrofil-hidrofób vizsgálata alapján (például víz-cseppentéssel, továbbá paraffin-cseppentéssel) (2. ábra).

Attól függően, hogy milyen körülmények között végezzük a mikrobák szelekcióját, azok bontási aktivitásán túl, információt nyerhetünk azok életfeltételeiről is. Így a bioremediációra alkalmazott mikrobák lehetnek "hidegkedvelők" (pszichrofilek), közepes hőmérsékleteket kedvelők (mezofilek), vagy a megszokottnál magasabb hőmérsékletet kedvelők (termofilek).

Oxigénigényük tekintetében aerob, anaerob, vagy fakultatív anaerob mikrobák nyerhetők. Hatékonyságuk és alkalmazásuk gazdaságossága alapján a bioremediációs

folyamatokra többnyire mezofil-aerob, termofil-anaerob, illetve fakultatív anaerob mikroorganizmusok jöhetnek számításba. Előnyösek a fakultatív anaerobok. Ezek szelektálásához azonos találmány szerinti követelményen túl, hogy a táptalaj anoxikus légzést elősegítő anyagokat tartalmazzon, szükséges az is, hogy egy ideig a tenyészetet anaerob körülmények között inkubáljuk.

Adott esetben követelmény lehet, hogy a bioremediációra alkalmazott mikroorganizmusok ne idézzenek elő sem növényi, sem állati, vagy emberi megbetegedéseket, azaz apatogéneknek kell lenniük (1, 2). Más esetekben akár megbetegedést előidéző mikroorganizmusok is alkalmazhatók, amelyek később elpusztulnak, vagy emberre veszélytelenek. Ilyen módon akár egyidejű kártevő- vagy gyomirtás is megvalósítható.

Szénhidrogének bontására az említett szelekciós módszerünkkel *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., stb. mikroorganizmusokat izoláltunk kőolajjal szennyezett talajokból, melyek közül az alábbiakat Budapesten a National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms gyűjteményében deponáltunk 2002. április 17-én:

| | |
|-------------|----------------------|
| MOL-jelzet: | Nyilvántartási szám: |
| MOL-2 | NCAIM (P) B 1304 |
| MOL-32 | NCAIM (P) B 1305 |
| MOL-51 | NCAIM (P) B 1306 |
| MOL-66 | NCAIM (P) B 1307 |
| MOL-107 | NCAIM (P) B 1308 |

Mikroorganizmusok lehetnek genetikailag módosítottak, előnyösen markerként genomjába beépített ismert szekvenciájú DNS-fragmentumot hordoznak.

Fakultatív anaerob mikroorganizmusok szelekciója során a pl. következő anoxikus légzést lehetővé tevő elektron akceptorokat, illetve hidrogénakceptorokat alkalmazhatjuk: nitrit- (NO_2^-) nitrát- (NO_3^-), foszfát- (PO_4^{3-}), vagy szulfát- (SO_4^{2-}) sók, valamint egyéb, a

nitrátlégzést lehetővé tevő elektronakceptor(ok) (NO_2 , NO_3 , PO_3 , PO_4 , P_2O_4 , P_2O_7 , ClO_4 , BO_4 , B_2O_7) azok anorganikus sóit, vagy organikus anyagok.

Egy igen előnyös megvalósítási mód szerint adalékanyagként anorganikus légzést katalizáló elektronakceptorokat, pl. fémionokat, illetve ezek sóit, előnyösen Zn-iont vagy Ti-iont, pl. TiCl_2 -só formájában, alkalmazhatunk.

A szelekció során, az adalékanyagok összeállításakor előnyösen tekintettel vagyunk annak a környezetnek a minőségére, összetételére, amelyben a mikroorganizmust alkalmazni kívánjuk.

Ha a kezelendő terület talaj, például az altalajban a N- és P-tartalmú anionok ritkák, míg a S-tartalmú (pl. SO_4^{2-}) anionok, valamint a K^+ - és Ca^{2+} -ionok nem. Ugyancsak célszerű a talajban ritka, az enzimek katalitikus működése szempontjából szükséges ionokat, pl. mangán-, molibdén, titán- és cinkionokat biztosítani a baktériumok számára.

A szelekciós eljárásunkkal izolált, illetve a robbantás során alkalmazható mikroorganizmusok tevékenységét és bontó aktivitását előnyösen befolyásoló adalékanyagokat a teljesség igénye nélkül az 1. táblázatban foglaltuk össze:

| |
|--|
| anoxikus légzést elősegítő anyagok, előnyösen redoxrendszerek és elektronakceptorok, célszerűen több oxidációs állapotú fémek vegyületei (pl. vas-, réz-, titán-, mangán vagy molibdén-ionok, vagy manganátok és/vagy molibdenátok), valamint nitrit, nitrát, foszfát, pirofoszfát, szulfit, szulfát, piroszulfát ionok vagy sóik, |
| enzimek aktivitását fokozó fémionok és nyomelemek, célszerűen vas-, réz-, nikkel-, kobalt-, mangán-, magnézium-, cink- vagy kalciumionok, |
| szénforrások, előnyösen glükóz, szacharóz, melasz, glicerin, acetát, xantán, |
| nitrogénforrások, előnyösen pepton, nitrit, nitrát, ammónium ionok vagy sóik, |
| foszforforrások, előnyösen foszfát, pirofoszfát vagy sóik, |
| kénforrások: szulfát, piroszulfát ionok vagy sóik, |
| tenzidek és/vagy felületaktív anyagok, előnyösen Tween 20, Tween 40, Tween 60, |

Tween 80, nonit, DMSO,

felülethez való tapadást elősegítő anyagok, előnyösen bármely természetes vagy szintetikus polimer, például poli-akrilamid, poli-vinilpolimer, előnyösebben biológiailag lebontható polimerek, például hidrokolloidok, igen előnyösen xantán.

Nyilvánvaló, hogy az adalékanyagokat a mikrobákra nézve nem toxikus mennyiségben kell a táptalajhoz adni.

PÉLDÁK

1. Példa – Tenyésztés minimál táptalajon

A kérdéses szennyezést (kőolajkomponenseket, például paraffinok, aszfaltének, maltének, stb., vagy kőolajszármazékokat) tartalmazó talajmintákból fiziológias sóoldattal, vagy előnyösen bármely élettanilag alkalmazható, pH 6.5 – 7.5 kémhatású pufferral híg (1 – 20%-os) szuszpenziót készítettünk, ennek különböző hígításait un. "agar-agar minimál táptalajra" leoltottuk, s a kívánt hőmérséklen, előnyösen 0 – 80°C-on, tetszőleges ideig, előnyösen 12 – 72 órán át inkubáltuk őket. Az izolált telepeket szennyezőanyag-bontási aktivitásuk alapján szelektáltuk.

Az "agar-agar minimál táptalaj" összetétele 1000 gr desztillált vízre számítva a következő volt:

0,1 - 3 g, előnyösen 2.5 g Na_2HPO_4

0.1 - 3 " " 1.5 " KH_2PO_4

0.1 - 3 " " 0.5 " $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.01- 3 " " 0.05 CaCl_2

0.5 - 3 " " 2.0 " agar-agar

0.1 - 5 " " 1.5 " NaNO_3 ,

Látható, hogy a táptalaj anoxikus légzést elősegítő ionokat (PO_4^{3-} ill. protonált formái, SO_4^{2-} , NO_3^-), azaz elektronakceptorokat tartalmaz, ami lehetővé teszi aerob és fakultatív aerob mikroorganizmusok szelektálását is.

Előnyösnek talált esetekben a fenti táptalajt kiegészítettük 1 – 50 ml, még előnyösebben 10 ml alábbi, 1000 ml-ben oldott nyomelemek törzsoldatával készítettük el:

0.1 – 0.5 g előnyösen 0.25 g H_3BO_4

0.1 - 1.0 “ “ 0.25 “ CoCl

0.1 - 2.0 “ “ 0.25 “ CuCl_2

0.05- 2.0 “ “ 0.25 “ FeSO_4

0.01- 1.0 “ “ 0.025 “ MnCl_2 ,

0.01- 1.0 “ “ 0.025 “ NaMoO_4

0.01- 1.0 “ “ 0.025 “ NiCl_2

0.01- 1.0 “ “ 0.025 “ TiCl_4

A több oxidációs állapotú fémionok (pl. Ti-, Mn- és Mo-ionok) mint redoxrendszerek szintén elősegítik az anoxikus légzést.

2. Példa – Szilikagéles táptalaj

A szennyezett talajminták mikroflórája kitenyészthető steril, ún. “szilikagéles minimál táptalajon is, mely az ún. Vinogradszkij-féle szilikagéles szilárd táptalaj 1. példában megadott anyagokkal dúsított változata.

A “szilikagéles minimál táptalajon” termofil ($50-80^\circ\text{C}$) és extrém módon termofil ($80-110^\circ\text{C}$) mikroorganizmusokat is tenyészthettünk és szelektálhattunk.

3. Példa - Szennyezőanyag-bontó aktivitás vizsgálata

A “minimál táptalajokon” izolált mikroorganizmusok szennyező anyagokat bontó képessége is tanulmányozható ugyanezek a táptalajokon. Ilyenkor úgy járunk el, hogy a kérdéses “minimál táptalajra” valamilyen oldószerben, előnyösen könnyen illékony oldószerben (alkohol, acetone, éter, stb.), hidrofób szennyező anyagok (pl. szénhid-

rogének, lipoidok, stb.) esetében még előnyösebben pentánban vagy hexánban oldva, az ismert szennyező anyagból vékony filmet rétegeztünk, s a vizsgálandó mikroorganizmusokat erre oltottuk le (1. ábra).

A leoltásokat kívánt hőmérsékleten és meghatározott oxigénkoncentráció mellett, tetszőleges ideig, előnyösen 12–96 óráig, még előnyösebben 48 óráig inkubáltuk, s a képződött telepekkel ezt az eljárást néhányszor, előnyösen 2 – 3-szor megismételtük.

A kontrollált oxigénkoncentráció lehetőséget biztosított arra, hogy szelekciós módszerünket aerob, illetve anoxikus viszonyok között kivitelezve előnyösen olyan mikroorganizmusokat izoláljunk, amelyek mind aerob, mind pedig anoxikus viszonyok között kifejtetik aktivitásukat. Az ilyen fakultatív anaerobok izolálásakor tehát legalább a tenyésztés egy részét anoxikus körülmények között végeztük, a táptalajhoz pedig anoxikus légzést elősegítő anyagokat adtunk.

Ha az így izolált mikroorganizmusok a film formájában felvitt szennyező anyagokat telepeik környezetében átalakították vagy elbontották, ezt a kérdéses anyagok feltisztulása, vagy elszíneződése jelezte (1. ábra).

Az alábbiakban bemutatjuk, hogyan ellenőriztük a bontás hatékonyságát, a feltisztulási zónában az adott idő alatt elbontott szennyezőanyagok arányát (3 ábra), ezáltal a kiválasztott enzimek aktivitását, valamint a lebontási folyamatokban előnyösen közrejátsszó, egyéb anyagok, közelebbről tenzidek megjelenését (2. ábra). Természetesen szakember erre a célra más módszereket is alkalmazhat.

4. Példa – Mikroorganizmusok hatásának vizsgálata

Olajbontó enzimek aktivitása

Steril, 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe töltött 15 ml "minimál agar-agar", vagy "minimál szilikagél" táptalaj felületére, 5%-os, hexánban, vagy toluolban oldott kőolajterméket rétegeztünk egyenletesen, s a képződött kőolaj filmre a szennyezett (talaj, talajvíz, stb.) környezetből vett mintákból kitenyésztett mikrobák (folyadék) tenyészetéből platina kaccsal vonalszerű leoltást végzünk, s a kívánt (aerob, vagy anaerob) körülmények között, s a választott hőmérsékleten (15-20, 30-35 vagy 50-85 °C-on), a kívánt

ideig (24-240 órán át) inkubáljuk, mindaddig, míg a mikroorganizmusok jól látható telepet képeznek. Abban az esetben, ha a leoltott mikroorganizmusok telepei környezetében a "szénhidrogén-film" valamilyen változását (feltisztult udvar, elszíneződés, stb.) észleljük, e zónákból dugófúróval mintát veszünk, oldószerrel (hexán, toluol, stb.) extraháljuk és GC-vel megvizsgáljuk a kőolajtermék mennyiségét és a benne lévő komponensek összetételét.

Olajbontó enzim(ek) termelési hatékonyságának (beleértve a baktérium életképességét) jó jellemzője a feltisztult zóna szélessége. Az enzimek aktivitására pedig hatásuk alapján, a kőolajtermék szénhidrogén-komponenseinek csökkenése alapján következtethetünk.

Néhány izolált mikroorganizmus-törzs aktivitását az 2. és a 3. táblázatban mutatjuk be ismert törzsekével összehasonlítva. A táblázatokban a törzsek jelentése a következő:

| | | |
|-------|-----------|--|
| | Hegboost* | |
| BO-1: | | |
| RO-1: | Hegrem* | |
| A | MOL-2 | NCAIM (P) B 1304 |
| B | MOL-32 | NCAIM (P) B 1305 |
| C | MOL-51 | NCAIM (P) B 1306 |
| D | MOL-66 | NCAIM (P) B 1307 |
| E | MOL-107 | NCAIM (P) B 1308 |
| F | MOL-113 | egy, általunk izolált <i>Pseudomonas sp.</i> törzs |

* Forgalmazza: Oil Cleaning Bio-Products Ltd. P.O.Box 46, Royston, Hertfordshire SG8 9PD U.K.. ld. a (mellékelt) terméktájékoztatókat.

2. táblázat

Baktérium csoportok hatása különböző molekulatömegű és o.p.-jű paraffinokra

| Csoport jele | paraffin | | | | |
|----------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | DW 6266 | DW 7580 | DW 5456 | DW 5658 | DW 5052 |
| BO-1 ° | + 6 | + 5 | + 6 | + 6-8 | + 4-7 |
| RO-1 ° | + 6 | + 6 | ++ 4-11 | + 3-6 | ++ 5-12 |
| A ^t | ++++ 15-18 | + 5-8 | +++ 10-15 | ++++ 11-19 | +++ 11-16 |
| B ^t | +++ 5-11 | + 5-6 | +++ 10-15 | ++++ 13-20 | +++ 10-16 |
| C ^t | +++ 10-15 | ± 4 | +++ 14-17 | +++ 14-18 | +++ 11-14 |
| D ° | + 5-7 | + 4-5 | ++++ 10-22 | ++++ 10-34 | + 4-7 |
| E ° | + 6-7 | +++ 10-13 | +++ 13-17 | +++ 11-13 | +++ 13-16 |
| F ° | ++ 9-12 | ++ 6-10 | ++ 7-12 | ++ 4-10 | ++ 7-12 |

t = enzim hatás, e = enzim tevékenység

aktivitás:

+ = csekély

++ = részleges

+++ = jó

+++ /++++ = kiváló

szám = bontott felület átmérője (mm)

3. táblázat

Különböző kőolajkiválások bontása baktérium csoportokkal 37 °C-on, 96 óra alatt

| Jelzés | hidrofob ^x | aszfaltén | maltén | 5% aszfaltén + Alg #571 olaj |
|--------|-----------------------|---------------|---------------|---------------------------------|
| BO-1 | + 4-7 | 9 | + 4-7 | ++ 6-12 |
| RO-1 | + 4-10 | 7 | + 4-8 | ++++ 15-18 |
| A | + 5 | ++++ 10-38 | ± 2 | ++++ 22-25 |
| B | + 4-8 | ++++ 14-20 | + 4-7 | ++++ 34-37 |
| C | + 4-6 | ++ 7-12 | ± 2-4 | ++++ 25-30 |
| D | + 3-6 | + 4 | + 4-8 | ++++ 30-35 |
| E | ++++ 22-25 | + 5-7 | ++++ 20-25 | ++++ 30-35 |
| F | + 4-5 | + 4-5 | ++++ 10-35 | 20-35 |

t = tenzid hatás, e = enzim tevékenység

aktivitás:

+ = csekély

++ = részleges

+++ = jó

+++ / ++++ = kiváló

szám = bontott felület átmérője (mm)

Mint a 3. ábrát a táblázatokkal összevetve látható, izolált törzseink legtöbbjének enzimaktivitása GC-vel mérve vetekedett a technika állása szerinti törzsekével, a feltisztult terület, mint sáv átlagos szélességével (bontott felület átmérője) jellemzett bontási

hatékonyságuk – szennyezőanyagtól függően – számos esetben szignifikánsan meghaladta azokét. Eljárásunkkal tehát célra szelektált, hatékony mikroorganizmusok állíthatók elő, és alkalmazási területüket előnyösen a leginkább hatékonyan bontott szennyezés fajtája szerint állapítjuk meg.

Tenzidtermelés kimutatása hidrofíl-hidrofób cseppentési próbával

Hasonlóképen járunk el, mint az olajbontó enzimek kimutatása esetében, azzal a különbséggel, hogy a vizsgált mikroorganizmusok – választott körülményei között képződött telepei környezetében – , a feltisztult zónában desztillált vizet, vagy olvasztott paraffint cseppentünk a táptalaj felületére. A desztillált víz a tenzidet tartalmazó zónában szétterül, a fel nem tisztult (hidrofób) zónában viszont elmozdítható, gömbalakú cseppet képez. Az olvasztott paraffin csepp a tenzidet tartalmazó zónában szétterül, s ez elmozdítható, viszont a hidrofób zónában megtapad és helyzetéből nem mozdítható el (2. ábra).

A cseppek felületi határszöge mérhető mennyiség, amely akár a tenzidtermelés kvantitatív jellemzésére is alkalmas lehet, természetesen egyéb paraméterek (tenyésztési idő, cseppentés helye) rögzítése esetén.

5. Példa – Alkalmazások

A találmány szerinti mikroorganizmusok felhasználhatók kőolajjal, kenőolajokkal, üzemanyagokkal és egyéb szénhidrogénekkal és azok különböző, (pl. halogénezett) származékaival, vagy peszticidekkel, herbicidekkel, toxikus hulladékokkal, általában bármely biológiailag lebontható/hatástalanítható xenobiotikumokkal szennyezett környezet talajvizek, szemétkerakók, stb. kárelhárítására.

A mikroorganizmusok ezen felül talajszennyezést előidéző környezeti katasztrófák (pl. földgáz és termálvíz kitörések, stb.) ,vagy súlyos talajszennyezések (pl. olajvezetékek károsodások, cian szennyezések, stb.) , környezetszennyező anyagokat tartalmazó árvizek, belvizek, különböző deponiák, stb. következményeinek mérséklésére és/vagy elhárítására is alkalmasak, melyek a talaj felszíne és a talajvíz szintje között helyezkednek

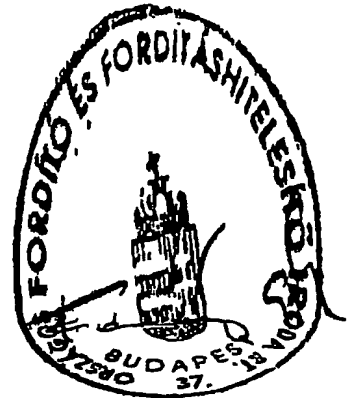
el. Felhasználhatók továbbá kőolajkiválások és lerakódások bontására tartályokban, csövekben stb.

Bizonyos esetekben azonban a talajvízbe már bejutott szennyezések kárelhárítására is alkalmazhatók.



IRODALOMJEGYZÉK

- 1.) Oil Cleaning Bio-Products Ltd. : Press release on Hegrem Bacteria (mellékelve)
- 2.) Oil Cleaning Bio-Products Ltd.: Press release on Hegboost bacteria (mellékelve)
- 3.) Thomas J.M. and Ward C.H. (1989): Environ.sci.technol. 23 760-766.
- 4.) Van der Meer et al . (1992): Microbiol. Rev. 56. 677-694.
- 5.) Kopp-Holtwiesche B. et al.,(1992): Biotech. Forum Europe . N.6.
- 6.) Sloan R.,(1987): Oil and Gas J. 61-66.
- 7.) Bouwer E.J. and Zehnder A,J.B. (1993) :TIBTECH 11. 360-367.
- 8.) Plumb R.H.J. (1991): Groundwater monitoring Rev. 11. 157-164.
- 9.) Rijnarts H.H. et al. (1990): Environ.Sci.Technol. 24.1349-1354.
- 10.) Bouwer E.J. and Ward C.H. (1989): Environ Sci. Technol. 23. 760-766



HEGBOOST

TERMÉK BIZTONSÁGI ADATLAPJA

--1. kiadás---kelt: 1997. november 30.

I. SZÁLLÍTÓ: Oil-Cleaning Bio-Products Ltd., P.O. BOX 46, Royston, Hertfordshire SG8 9PD, U.K. Tel: (+44) (0)1763 287 749.

II. LEÍRÁS ÉS ÖSSZETÉTEL:

Általános leírás: Biológiaiilag lebontható folyadék, adalék a Hegrem márkanévű termékhez a szennyezett talaj biológiai helyreállításának utolsó fázisában.

Összetétel: Felületaktív anyagok, habzásgátlók és baktérium-tápanyagok keveréke; szétválasztott korpa természetes baktériumokkal.

III. VESZÉLYFORRÁS AZONOSÍTÁSA: Az 1993-as *The Chemical Hazards (Information and Packaging) Regulations (CHIP)* [Rendelkezések a Kémiai Veszélyforrásokról (Tájékoztatás és csomagolás)] 5. rendelkezése értelmében történő kiszállítás mellett az anyag nem tekintendő veszélyesnek. A gyártó ezt a tájékoztatást a CHIP 6. függeléké szerint, az 1974-es Munkaegészségügyi és Munkabiztonsági Törvény 6(4) §-a követelményeinek megfelelően adja.

IV. ELSŐSEGÉLY TÚLZOTT EXPOZÍCIÓ ESETÉN :

SZEM VAGY BŐR: Nem várható problémák fellépése. Szükség esetén öblítés vagy mosás vízzel.

LENYELÉS: Hányingert okozhat. Bőségesen itassunk vizet, hánytatni nem szabad. Ha a rosszullét tartós, forduljunk orvoshoz.

BELÉGZÉS: Problémák jelentkezése nem várható.

V: TŰZ- ÉS ROBBANÁS-VESZÉLYESSÉGI ADATOK, TŰZOLTÁS MÓDJA: Nem gyúlékony.

VI. ELJÁRÁS AZ ANYAG VÉLETLEN KISZABADULÁSA ESETÉN: Kis mennyiségű kiömlött anyagot a szennyvízelvezetőbe söpörhetünk. Nagyobb mennyiségeket itassunk fel abszorbenssel, helyezzük hulladéktároló konténerbe és kezeljük az idevonatkozó rendeleteknek megfelelően.

VII. A TERMÉK TÁROLÁSA ÉS KEZELÉSE:

TÁROLÁS: Hűvös, száraz helyen, közvetlen napsugárzástól védve. Ne tároljuk 5 °C alatt és 40 °C felett.

-19-

HEGREM

TERMÉK BIZTONSÁGI ADATLAPJA



ocpsds 5---6. kiadás

kelt: 1999. augusztus 18.

I. SZÁLLÍTÓ: Oil-Cleaning Bio-Products Ltd., P.O.BOX 46, Royston, Hertfordshire SG8 9PD, U.K. Tel: (+44) (0)1763 287 749

II. LEÍRÁS ÉS ÖSSZETÉTEL:

Általános leírás: Veszélytelen, biológiailag lebontható abszorbens és biológiai helyreállító szer.

Összetétel: Kezelt természetes cellulózrostokból álló szabadon folyó por, a rostok saját természetesen előforduló baktériumaival.

III. VESZÉLYFORRÁS AZONOSÍTÁSA: Az 1993-as *The Chemical Hazards (Information and Packaging) Regulations (CHIP)* [Rendelkezések a Kémiai Veszélyforrásokról (Tájékoztatás és csomagolás)] 5. rendelkezése értelmében történő kiszállítás és használat mellett az anyag nem tekintendő veszélyesnek. A gyártó ezt a tájékoztatást a CHIP 6. függeléke szerint, az 1974-es Munkaegészségügyi és Munkabiztonsági Törvény 6(4) §-a követelményeinek megfelelően adja.

Veszélyes összetevő: 29 CFR 1910: kellemetlen por.

Az USA Közlekedési Minisztériuma veszély-besorolása: nem veszélyes. Szállítási osztály: 50

IV. ELSŐSEGÉLY:

SZEMBE KERÜLÉS: Kivörösödést és irritációt okozhat. Kézmosás után vízzel öblítsük ki.

BŐRRE KERÜLÉS: Érzékeny bőrt ingerelhet. Nagyon érzékeny bőrűek viseljenek kesztyűt. Használat után szappanos kézmosás.

LENYELÉS: Hányingert vagy hasmenést okozhat. Bőségesen itassunk vizet, hánytatni nem szabad.

BELÉGZÉS: Allergiásoknál kellemetlen érzést okozhat. Nehezülő légzés esetén az érintettet vigyük friss levegőre.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hidrofób szennyezőanyag, kőolajkomponens vagy -származék bontására alkalmas, a bontó aktivitást a szennyezőanyagot, kőolajkomponenst vagy -származékot tartalmazó hidrofób fázis és egy hidrofil fázis határfelületén kifejteni képes mikroorganizmus izolált formában történő előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) a kőolajkomponenst vagy -származékot tartalmazó filmet szénforrást nem tartalmazó minimál táptalajra visszük fel,

ii) erre a táptalajra kőolajszennyezésből származó, mikroorganizmus-keveréket tartalmazó mintát oltunk le, a leoltás után a táptalajt legalább addig inkubáljuk, amíg észlelhető mikroorganizmus-telepet kapunk, amennyiben azonban ez tetszőlegesen meghatározott időtartamon belül nem következik be, az i) és jelen ii) lépéseket megismételjük,

iii) a kapott telepekből származó mikroorganizmusok bontó aktivitását megvizsgáljuk a telepek környezetében és

iv) a kapott telepekből származó, bontó aktivitású mikroorganizmusok tenzidtermelő képességét ellenőrizzük.

2. Az 1 igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fakultatív anaerób mikroorganizmust állítunk elő, azáltal, hogy anoxikus légzést elősegítő anyagokat, előnyösen elektronakceptorokat és/vagy oxigénforrásokat – célszerűen az alábbiak közül egyet vagy többet: Ti-vegyületek, Mn-vegyületek, nitrit, nitrát foszfát, pirofoszfát, szulfit, szulfát, piroszulfát ionok vagy sóik – tartalmazó minimális tápközeget alkalmazunk, és előnyösen a tenyésztést legalább egy ideig anaerob körülmények között végezzük.

3. A 2-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bontó aktivitást a telepek közvetlen környezetében vett minták szennyezőanyag-koncentrációjának vizsgálata vagy a bontott felület átmérője alapján állapítjuk meg.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy bontó aktivitásként paraffinbontó vagy jellegzetes szennyeződések bontó enzimaktivitást vizsgálunk, előnyösen mintavétel, oldószeres extrakció, majd gázkromatográfiás vizsgálat útján.

5. A 2-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapott telepekből származó mikroorganizmusok tenzidtermelő képességét hidrofil-hidrofób cseppentési próba alapján vizsgáljuk meg.

6. Kőolajkomponens vagy - származék bontására alkalmas, a bontó aktivitást a kőolajkomponens vagy származék és egy vizes fázis határfelületén kifejteni képes mikroorganizmus, amely legalább egyféle, a kőolajkomponens vagy -származék bontásának katalizálására alkalmas enzimet, valamint legalább egyféle tenzidet termel.

7. A 6. igénypont szerinti mikroorganizmus, amely a *Bacillus subtilis* fajba, *Bacillus cereus* fajba, *Pseudomonas* vagy *Xanthomonas* nemzetségbe tartozó fajba tartozó törzs.

8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti mikroorganizmus, *azzal jellemezve*, hogy fakultatív anaerób.

9. A 6-8. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, *azzal jellemezve*, hogy kőolajszennyezés-bontó aktivitása szennyezett táptalajon történő tenyésztéssel ki-mutatva a Hegrem vagy a Hegboost törzsekénél az alábbi kőolajszennyezések legalább egyikén mérve átlagosan legalább 1,5-szer nagyobb: hidrofób kiválás, aszfaltén, maltén, 5% aszfaltén + olaj.

10. A 6-9. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, *azzal jellemezve*, hogy az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárással állítható elő.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, amely a NCAIM-nál a NCAIM (P) B 1304, NCAIM (P) B 1305, NCAIM (P) B 1306, NCAIM (P) B 1307 vagy a NCAIM (P) B 1308 számon, 2002. április 17-én letétbe helyezett törzsek bármelyike vagy azok bármelyikéből származó törzs.

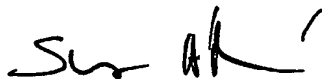
12. A 6-10. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, amely genetikailag módosított, előnyösen markerként genomjába beépített ismert szekvenciájú DNS-fragmentumot hordoz.

13. A 6-12. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus alkalmazása kőolajkomponens vagy -származék okozta talajszennyezés lebontására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

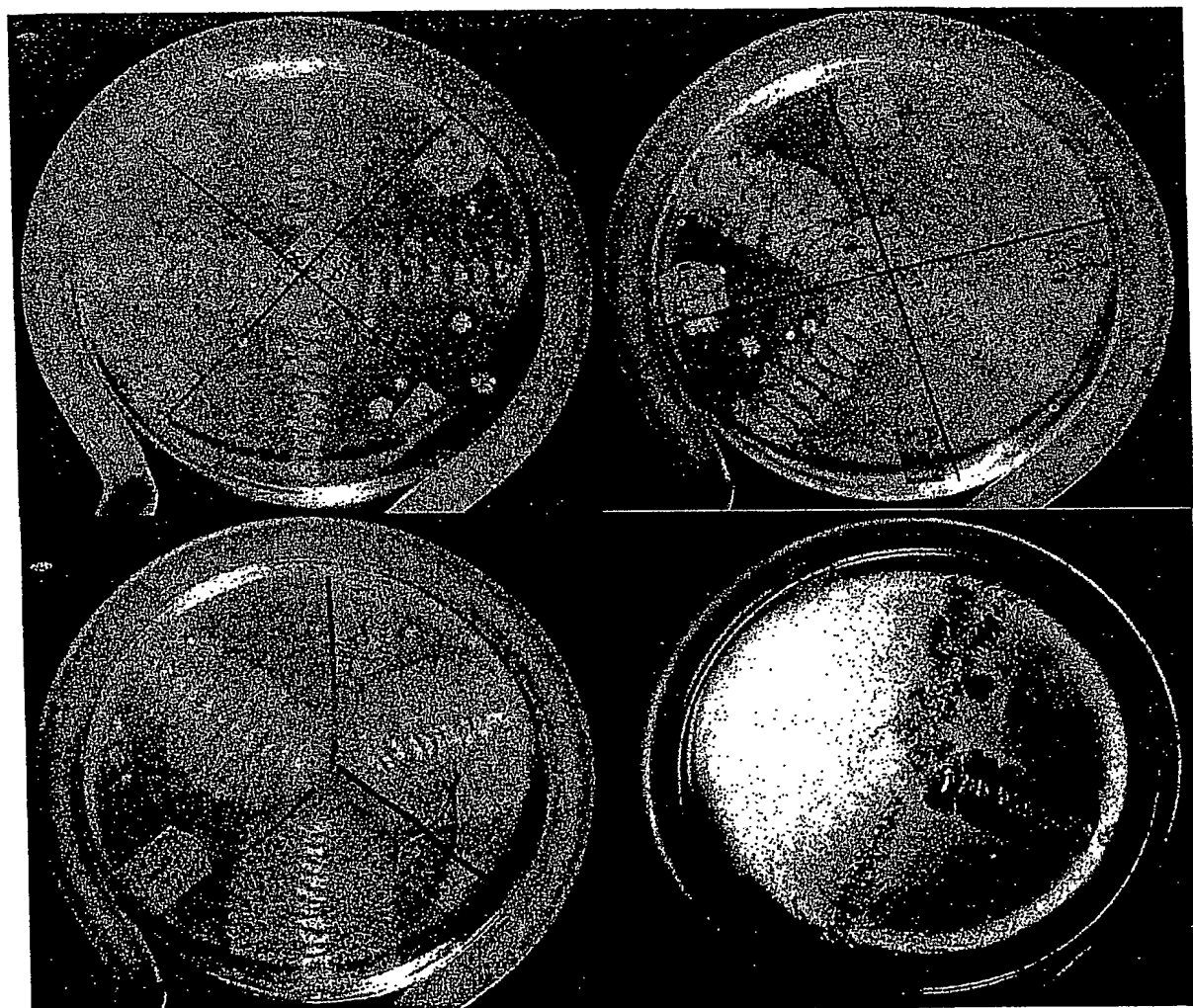
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Dr. Svingor Ádám

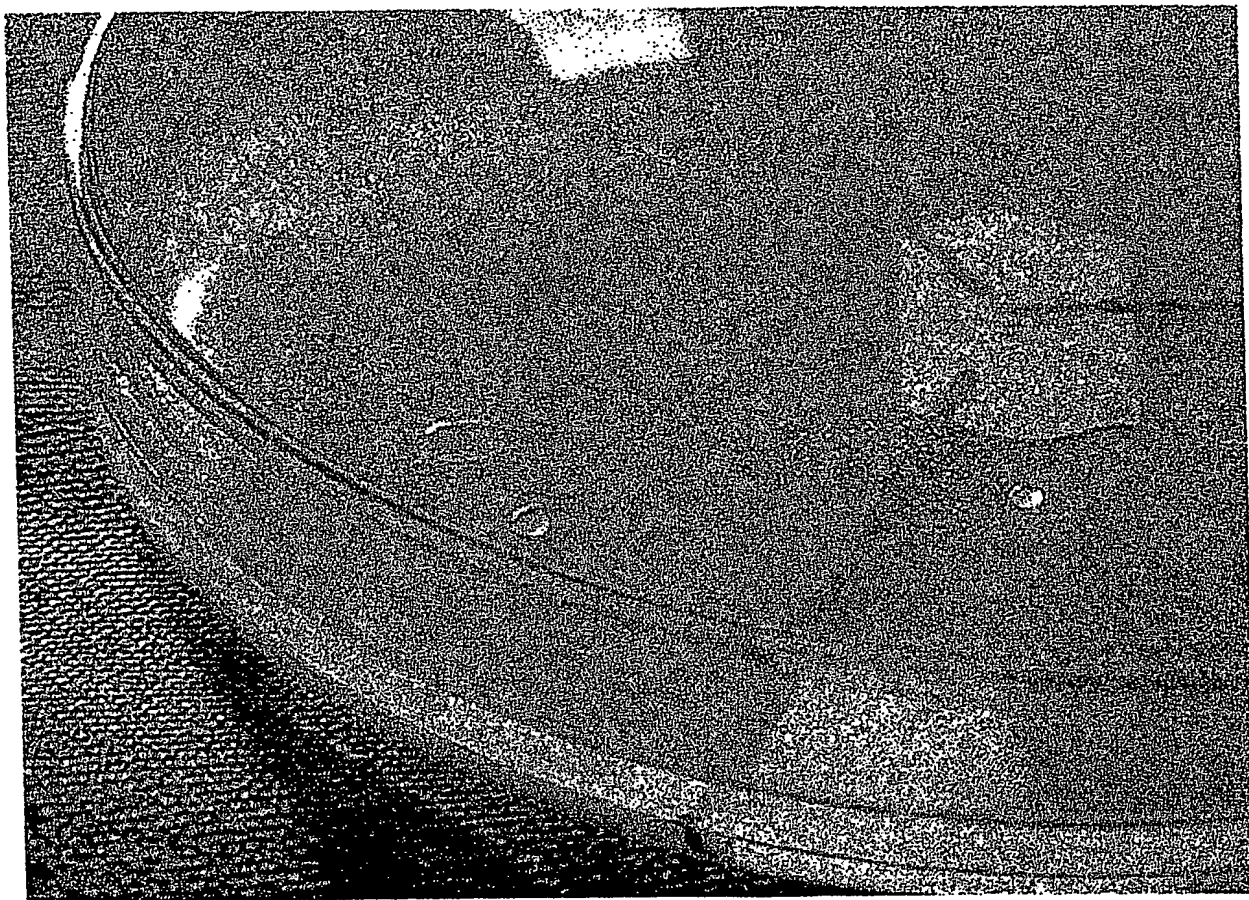
szabadalmi ügyvivő

Olajbontó törzsek szelektálása

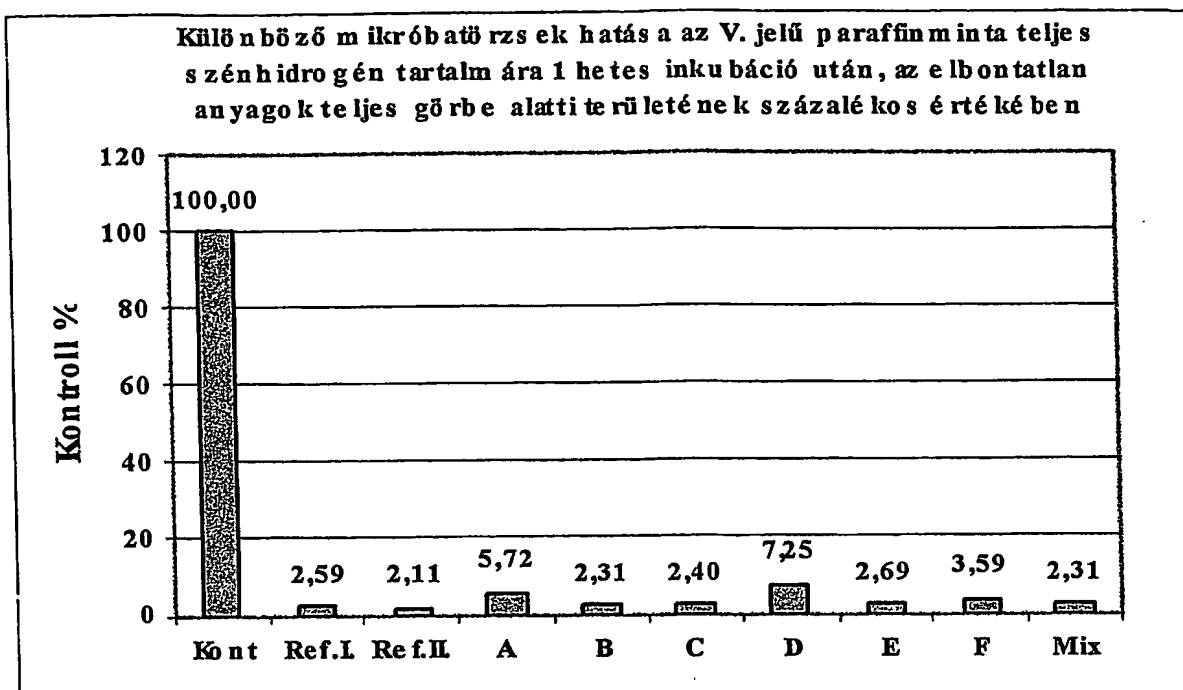


1. ábra

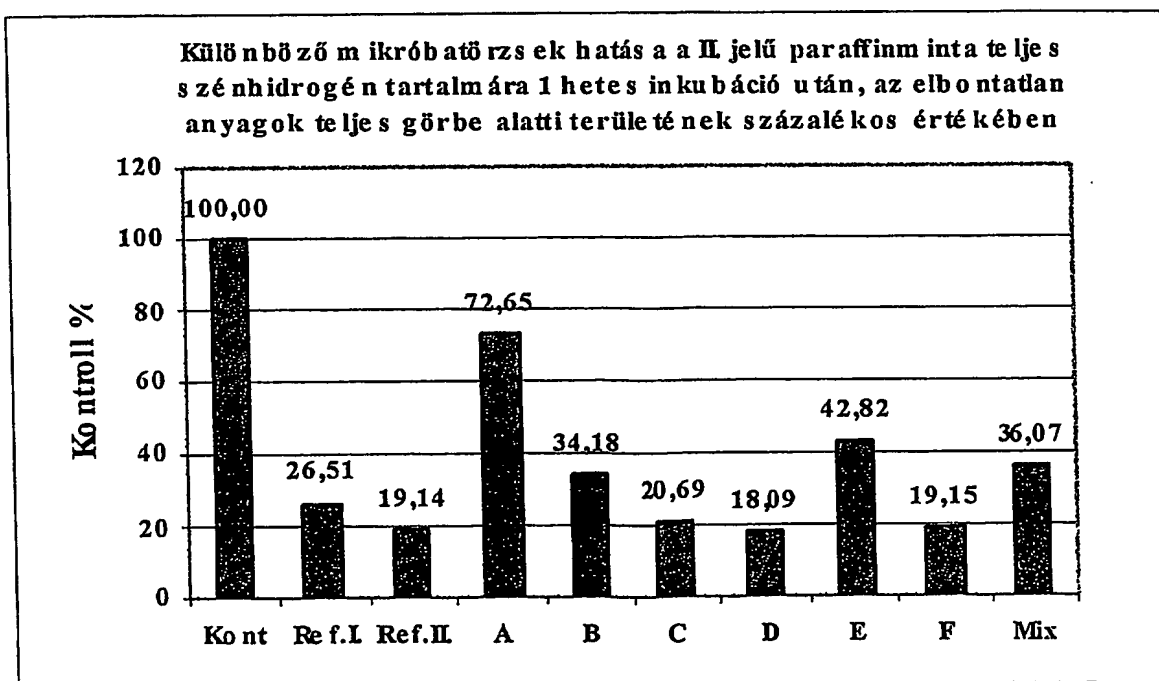
Tenzidhatás kimutatása



2. ábra



3/a. ábra



3/b. ábra